

Niveles de plomo y daño en el ADN en niños con trastornos del espectro autista

Lead levels and DNA damage in children with autistic spectrum disorders

Dra. Elena Noris-García,^I Lic. Alexis Rodríguez- Rey,^{II} Dra. Mabel Whilby Santisteban,^{III} Dra. Leyanis Ramos Hernández,^{III} Dra. C. María de los Angeles Robinson-Agramonte,^{IV} Tec. Adisbel Pérez Cabrera^{II}

^I Instituto Nacional de Nefrología. La Habana, Cuba.

^{II} Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología. La Habana, Cuba.

^{III} Hospital Pediátrico del Cerro. La Habana, Cuba.

^{IV} Centro Internacional de Restauración Neurológica (CIREN). La Habana, Cuba.

RESUMEN

Introducción: los trastornos del espectro autista se consideran una familia de alteraciones del neurodesarrollo, caracterizada por dificultades en la comunicación y la interacción social, así como la existencia de un comportamiento estereotipado y repetitivo. Aunque existen varias hipótesis que involucran a factores genéticos y ambientales en su etiopatogenia, la verdadera contribución de estos aún se desconoce. En este estudio se explora la relación entre los niveles séricos de plomo, el daño del ADN y la severidad del autismo.

Métodos: se estudiaron 15 niños con el diagnóstico de trastornos del espectro autista entre 4 y 11 años de edad y un grupo control del mismo rango de edad. El coeficiente de inteligencia fue evaluado mediante la prueba de Terman-Merrill y los niños fueron clasificados en dos grados de retardo mental (ligero y moderado/severo). Los niveles de plomo en sangre fueron medidos por espectrometría de masa, mientras que el daño del ADN fue determinado en linfocitos de sangre periférica con el empleo de un ensayo de electroforesis alcalina (ensayo del cometa).

Resultados: no se mostró diferencia significativa en los niveles de plomo entre los grupos. El daño del ADN fue mayor en los pacientes autistas en relación con el grupo control, cuya diferencia fue significativa ($p < 0,05$), cuando comparamos los grupos teniendo en cuenta la severidad del retardo mental. Los pacientes con trastorno moderado/severo mostraron un daño del ADN significativamente superior a los que presentaron trastornos ligeros y al grupo control.

Conclusiones: los resultados confirman la presencia de daño del ADN en pacientes con trastornos del espectro autista, lo cual sugiere que este pudiera ser un factor que se relaciona con la severidad del retardo mental en estos enfermos.

Palabras clave: trastorno autístico, daño del ADN, plomo, ensayo cometa.

ABSTRACT

Introduction: autistic spectrum disorders are considered to be a family of neurodevelopmental alterations characterized by difficulty to communicate and interact socially, as well as stereotyped, repetitive behavior. Though several hypotheses involve genetic and environmental factors in the etiopathogeny of this condition, their actual participation is still unknown. The present study explores the relationship between serum lead levels, DNA damage and the severity of autism.

Methods: a study was conducted with 15 children 4-11 years old diagnosed with autistic spectrum disorders and a control group from the same age range. The intelligence quotient was measured by the Terman-Merrill test, and children were classified into two degrees of mental retardation (mild and moderate/severe). Blood lead levels were measured by mass spectrometry, whereas DNA damage was determined in peripheral blood lymphocytes using the alkaline electrophoresis assay (the comet assay).

Results: this study did not show any significant difference in lead levels between the groups. DNA damage was greater in autistic patients than in the control group, and the difference was significant ($p < 0.05$) when mental retardation severity was considered. Patients with a moderate/severe disorder showed significantly greater DNA damage than those with mild disorders and the control group.

Conclusions: results confirm the presence of DNA damage in patients with autistic spectrum disorders, suggesting that this factor could be related to mental retardation severity.

Key words: autistic disorder, DNA damage, lead, the comet assay.

INTRODUCCIÓN

Los trastornos del espectro autista (TEA) son alteraciones del neurodesarrollo caracterizadas por dificultades en la comunicación, en la interacción social, en la atención, en los trastornos cognitivos y en los defectos en el aprendizaje, así como por la existencia de un compartimiento e intereses estereotipados y repetitivos. Su diagnóstico se realiza principalmente en niños entre 2 a 10 años de edad con un pico de prevalencia entre los 5 y 8 años.¹ Aunque su presentación ocurre temprano en la infancia, sus manifestaciones típicamente perduran toda la vida.² Su prevalencia en el mundo se ha incrementado significativamente en los últimos años

a 1/150. El género masculino es más afectado que el femenino, en una proporción aproximadamente de 4:1.³ Sin embargo, la proporción parece variar con el coeficiente de inteligencia y va desde 2:1 en los que presentan una grave disfunción hasta más de 4:1 en los que tienen un coeficiente de inteligencia normal.^{4,5}

A pesar de las teorías e investigaciones dirigidas a identificar las causas de este trastorno y el porqué de su aumento, estas aún se desconocen.⁶ Resulta un gran reto para la neurociencia actual poder conocer y profundizar en los mecanismos biológicos involucrados en su etiopatogenia, así como sobre la verdadera contribución de factores genéticos, epigenéticos y ambientales involucrados.

Diferentes toxinas ambientales, tales como metales pesados, pesticidas e infecciones maternas, han sido propuestas en la etiopatogenia del autismo; estas comparten la propiedad de incrementar el estrés oxidativo, que causa daño en las proteínas del ADN.^{7,8}

Basados en estos hallazgos científicos que invocan la combinación de factores bioquímicos con una susceptibilidad genética en la patogenia de estos pacientes, nos propusimos explorar la relación entre el comportamiento de los niveles de plomo sérico, la presencia de daño del ADN y la severidad del retardo mental en pacientes autistas.

MÉTODOS

Se realizó un estudio observacional descriptivo longitudinal en un grupo de 15 niños comprendidos entre los 4 y 11 años de edad, 11 varones y 4 niñas, procedentes de la consulta de psiquiatría del Hospital "Pediátrico del Cerro", en La Habana. La muestra de estudio estuvo formada por todos los niños con el diagnóstico de autismo primario según los criterios de la Décima Clasificación Internacional de las Enfermedades (CIE- 10),⁹ que acudieron a esta consulta durante el año 2011. Se excluyeron del estudio los niños que padecían de un autismo secundario o de autismo primario más cualquier otra enfermedad crónica concomitante. Además, fueron estudiados 15 niños controles del mismo rango de edad (sin trastornos del aprendizaje, ni enfermedad endocrino-metabólica o infecciosa en el momento del estudio) a los que se les realizó una extracción de sangre porque iban a ser sometidos a una cirugía menor.

El coeficiente de inteligencia fue evaluado acorde con la prueba de Terman-Merrill, y los niños fueron clasificados, según el grado de severidad, en dos grupos: trastornos ligeros y moderados/severos.¹⁰ Los niveles de plomo fueron determinados en 1 mL de sangre total por el método de espectrofotometría de absorción atómica con horno de grafito por corrección Zeeman¹¹ con valores de referencia en un rango entre 0-10 µg/dL.¹²

El daño del ADN fue estimado por el ensayo cometa (Electroforesis alcalina de células individuales de leucocitos de sangre periférica), aislando linfocitos en una muestra de sangre total (control negativo), que se utilizó en una corrida electroforética junto a los linfocitos de los pacientes. En cada gel las muestras se montaron por duplicado. Se realizó un conteo de 100 células por gel y se calculó la media del conteo por individuo. Se reportó en cada caso el grado de daño del ADN, por inspección visual, acorde con el método reportado por Collins¹³ y los resultados finalmente se expresaron en unidades arbitrarias, con valores comprendidos entre 0 y 400.

El estudio fue realizado tras la obtención del consentimiento informado de los padres de los pacientes y la aprobación del consejo científico de la institución. Además, estuvo justificado desde el punto de vista ético en conformidad con los principios éticos de la declaración de Helsinki.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los valores fueron expresados en medias y desviaciones estándar y las diferencias entre los grupos de pacientes y controles fueron analizadas mediante la prueba de t student. Se aceptó como nivel de significación estadística valores de $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

De los 15 pacientes estudiados, la prueba de Terman-Merrill mostró que 7/15 niños fueron clasificados como TEA con retardo mental ligero y 8/15 como TEA con retardo moderado-severo. La tabla muestra los niveles de plomo observado en los diferentes grupos. Estos no mostraron diferencias significativas entre los pacientes con TEA con diferentes grados de severidad, ni entre estos pacientes y los controles.

Tabla. Niveles de plomo sérico en pacientes con TEA y controles

Grupos	Media	DE	P
Control	2,82	1,17	*0,21
Austismo	3,66	1,76	*0,14
Autismo ligero	2,3	1,35	**0,17
Autismo moderado/severo	4,77	0,75	*0,2

* Contra el grupo control.

**Ligero contra el grupo de moderado/severo.

El estudio del daño del ADN, evaluado por el ensayo de cometa, se muestra en la figura 1. Los pacientes con TEA, mostraron un aumento ligero del daño comparado con el grupo control, aunque de forma no significativa ($p = 0,26$). Sin embargo, cuando comparamos los subgrupos de pacientes según su coeficiente de

inteligencia (evaluado por la prueba de Terman-Merrill: TES ligero y moderado-severo), se observó un aumento significativo del daño del ADN. El segundo grupo (moderado-severo) mostró mayor grado de afectación comparado con los menos afectados ($p = 0,031$) y que el grupo control ($p = 0,046$). Los pacientes clasificados como ligeros y el grupo control ($p = 0,88$) no mostraron diferencias significativas (Fig. 2).

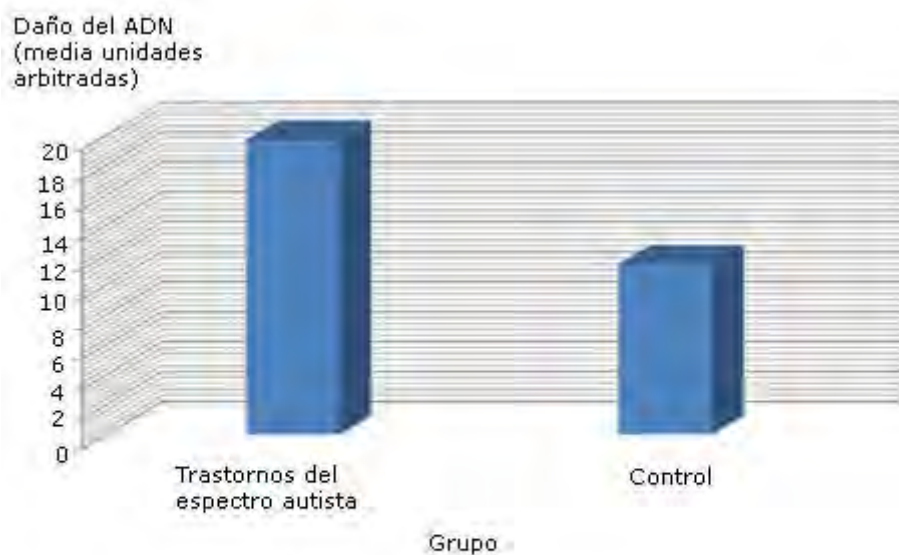


Fig. 1. Evaluación del daño del ADN mediante el ensayo cometa.



Fig. 2. Niveles del daño del ADN en pacientes con trastornos del espectro autista con diferentes grados de severidad.

DISCUSIÓN

Las teorías que abordan la implicación de factores genéticos y ambientales en el autismo parecen ser muy prometedoras. Existe un marcado interés científico en disipar las incógnitas que rodean al metabolismo de los metales pesados en niños con TEA con la sospecha de que estos puedan ser un factor importante en la etiología de este trastorno.

Varios estudios abordan el comportamiento de diferentes metales como mercurio, plomo y selenio en los TEA, y señalan que dichos metales pueden ser perjudiciales tanto en exceso como en defecto.¹⁴ Aquellos trabajos referidos al metabolismo del plomo, resultan controversiales. Algunos estudios apuntan a trastornos en la excreción del plomo, mientras otros describen una excreción similar a los controles sanos, de la misma manera que se han encontrado niveles séricos de este metal superiores o iguales a la población supuestamente sana, en correlación con la expresión de determinados genes.¹⁵⁻¹⁷ Más recientemente, *Lakshmi Priya y Geetha*,¹⁸ observaron una elevación significativa de las concentraciones de plomo en pelos y uñas de estos pacientes en correlación con el grado de severidad de la enfermedad.

En este estudio observamos un ligero aumento en las concentraciones del plomo en los pacientes con TEA a expensas de los clasificados como moderado/severo. No obstante, otros estudios deben ser conducidos, para confirmar la hipótesis referida al plomo como un posible agente causal de esta enfermedad, por la heterogeneidad de los TEA.

Por otro lado, la utilidad del análisis del plomo en otros tejidos (pelo y uña) es confirmada por muchos autores, quienes apoyan la correlación entre la concentraciones de los metales en el pelo y otros fluidos corporales en condiciones fisiológicas y patológicas. Estas estructuras tienen la ventaja de que reflejan cambios metabólicos de los elementos químicos por largos periodos de tiempo y en ellas sus concentraciones no están sujetas a las fluctuaciones producidas por la dieta o el agua, por lo que se considera uno de los mejores bioindicadores para el análisis de los metales.^{19,20} De ahí que resultaría de interés la continuidad de estos estudios en muestra de pelo y uñas y/o en un número mayor de pacientes que permitan descifrar la real contribución del plomo en la etiopatogenia del TEA.

La relación entre los agentes ambientales, el incremento del estrés oxidativo y el daño del ADN, es otro aspecto muy estudiado en los últimos años en la etiología de los pacientes con TEA.²¹ El incremento del estrés oxidativo ha sido reportado en varias enfermedades neurodegenerativas, tales como la enfermedad de Parkinson y de Alzheimer,²² así como en los TEA.

Entre las técnicas para medir el daño del ADN, el cometa se caracteriza por ser un método sensible (supera en más de 100 veces las pruebas citogenéticas), rápido, de bajo costo, sencillo y aplicable a cualquier célula eucariótica.^{23,24} Esta puede aplicarse en las más disímiles circunstancias; principalmente se ha utilizado para el estudio del daño genético inducido por mutágenos ambientales, nitrosaminas, drogas, radiaciones, entre otros.^{25,26} Sin embargo, no ha sido reportado su uso en pacientes con TEA.²⁷ Esta técnica solo explora la presencia del daño del ADN por ruptura en la hebra simple del ADN en sitiosapurínicos y apirimidínicos, que aumentan por la pérdida de las bases dañadas. Estos daños no pueden ser relacionados específicamente con la oxidación e incluso pueden representar intermediarios de los procesos de reparación.²⁷

Existen varias observaciones que apoyan la hipótesis de que el daño del ADN en los pacientes autistas es principalmente de carácter oxidativo y que está asociado con alteración en la expresión de neurotrofinas importantes para el normal crecimiento y diferenciación del cerebro.²⁸ Por ejemplo, recientemente se ha reportado un incremento en pacientes TEA tanto de la 3 N tirosina como del 8 hidroxidesoxiguanosina (8-OHdG) ambos marcadores de daño oxidativo del ADN,²⁹ así como niveles alterados de la neurotrofina 3 en el cerebro de pacientes con TEA, lo cual puede contribuir a la patología del autismo y afectar las sinapsis cerebrales, exacerbar el estrés oxidativo y ocasionar las alteraciones en las células de Purkinje de estos pacientes.³⁰

De manera general, las observaciones que correlacionan el daño oxidativo con las alteraciones estructurales y funcionales en el sistema nervioso central pudieran explicar el incremento significativo del daño de ADN en los pacientes con mayor grado de severidad del retardo mental (moderado a severo).

Estos resultados apoyan la presencia de daño del ADN en estos pacientes, y sugieren que ese daño en los pacientes autistas pudiera ser un factor que se relaciona con el grado de retardo mental en estos enfermos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. El-Ansary AK, Bacha AG, Al-Ayahdi LY. Plasma fatty acids as diagnostic markers in autistic patients from Saudi Arabia. *Lipids Health Dis.* [Internet]. 2011 [cited 10 Aug 2011];10(4): [about 3 p.]. doi:10.1186/1476-511X-10-62. Available from: <http://www.lipidworld.com/content/10/1/62>
2. Theoharides TC, Kempuraj D, Redwood L. Autism: an emerging 'neuroimmune disorder' in search of therapy. *Exp Opin Pharmacot.*2009;10(13):2127-43.
3. Naranjo Álvarez RJ. El autismo. Generalidades, Neurobiología, Diagnóstico y Tratamiento. *Rev Hosp Psiquiat Habana* [Internet]. 2011 [citado 12 de diciembre de 2011];8(1): [aprox 1 p.]. Disponible en: <http://www.revistahph.sld.cu/>
4. Harrington JW. The actual prevalence of autism: are we there yet?. *Pediatrics* [Internet]. 2010 [cited 12 Aug 2011];126: about 3 p.]. Available from: <http://hinari-gw.who.int/whalecompediatrics.aappublications.org/whalecom0/content/126/5/e1257.full.pdf+html?sid=871057ee-da04-4434-ba66-c6a5f7140a2c>
5. Giarelli E, Wiggins LD, Rice CE, Levy SE, Kirby RS, Pinto-Martin J, et al. Sex differences in the evaluation and diagnosis of autism spectrum disorder among children. *Disab Health Jour.* [Internet]. 2010 [cited 12 Oct 2011];3(2): [about 4 p.]. Available from: http://hinari-gw.who.int/whalecompdn.sciencedirect.com/whalecom0/science?_ob=MiamiImageURL&cid=276914&user=2778716&pii=S1936657409000673&check=y&origin=browse&zone=rslt_list_item&coverDate=2010-04-30&wchp=dGLzVIV-zSkWz&md5=06450981ca2df60f91249e849df7cf3d/1-s2.0-S1936657409000673-main.pdf
6. Careaga M, Van de Water J, Ashwood P. Immune Dysfunction in Autism: A Pathway to Treatment. *Nuerotherapeutics* [Internet]. 2010 [cited 12 Oct 2011];7(3): [about 2 p.]. Available from: http://hinari-gw.who.int/whalecompdn.sciencedirect.com/whalecom0/science?_ob=MiamiImageURL&cid=273590&user=2778716&pii=S1933721310000450&check=y&origin=browse&zone=rslt_list_item&coverDate=2010-07-31&wchp=dGLzVIV-zSkWA&md5=fd5c2f7fdbdb7bd908f2ad34c4ea020b/1-s2.0-S1933721310000450-main.pdf
7. Brown GE, Jones SD, MacKewn AS, Plank EJ. An exploration of possible pre and postnatal correlates of autism: a pilot survey. *Psychol Rep.* [Internet]. 2008 [cited 11 Oct 2011];102(1): about 3 p.]. Available from: <http://www.crcnetbase.com/doi/pdf/10.1201/9781420068870-c3>
8. Pardo-Govea T, Soliz-Añes E. Immunogenetic aspects of autism: Review. *Invest Clin.* [Internet]. 2009 [cited 10 Sep 2011];50(3): [about 5 p.]. Available from: <http://hinari-gw.who.int/whalecomwww.scielo.org.ve/whalecom0/pdf/ic/v50n3/art13.pdf>
9. Whitaker S. The stability of IQ in people with low intellectual ability: an analysis of the literature. *Intellec Devel Disabil.* [Internet]. 2008 [cited 10 Sept 2011];46(2): [about 5 p.]. Available from: http://eprints.hud.ac.uk/4283/1/stability_of_IQ

10. Organización Panamericana de la Salud. Clasificación estadística internacional de enfermedades y problemas relacionados con la salud. 10ª revisión. Washington, DC: OPS; 1995.

11. Parson PJ, Slavin W. A rapid Zeeman graphite furnace atomic absorption spectrometric method for the determination of lead in blood. Spectrochimica Acta Part B: Atom spectr. 1993;48(6-7):925-39.

12. Pilliere F, Francoise C. Biotox. Guide biotoxicologique pour les médecins du travail. Inventaire des dosages biologiques disponibles pour la surveillance de sujets exposés á des produits chimiques [Internet]. Paris: INRS; 2007. about 53 p.]. ED 7912007 Sept [cited 11 Sep 2011]. Available from: [http://www.inrs.fr/inrs-pub/inrs01.nsf/IntranetObject-accesParReference/Ed%20791/\\$File/Visu.html](http://www.inrs.fr/inrs-pub/inrs01.nsf/IntranetObject-accesParReference/Ed%20791/$File/Visu.html)

13. Collins A. The Comet Assay for DNA Damage and Repair, Principles, Applications and Limitations. Molec Biotech. [Internet]. 2004 [cited 10 Sep 2011];26(3):[about 3 p.]. Available from: <http://hinari-gw.who.int/whalecomwww.springerlink.com/whalecom0/content/e62l3p154h35ttn8/fulltext.pdf>

14. Ozand PT, Al-Odaib A, Merza H, Al-Harbi S .Autism: a review. Jour Pediatr Neurol. [Internet]. 2003 [cited 11 Aug 2011];1(2): about 5 p.]. Available from: <http://hinari-gw.who.int/whalecomiospress.metapress.com/whalecom0/content/uet94gmdvqq861wf/fulltext.pdf>

15. El-Ansary AK, Bacha AB, Al-Ayahdi LY. Relationship between chronic lead toxicity and plasma neurotransmitters in autistic patients from Saudi Arabia. Clinical Biochemistry [Internet]. 2011 [cited 10 Dec 2011];44(13):[about 3 p.]. Available from: http://hinari-gw.who.int/whalecompdn.sciencedirect.com/whalecom0/science?_ob=MiamiImageURL&_cid=271896&_user=2778716&_pii=S0009912011013919&_check=y&_origin=browse&_zone=rslt_list_item&_coverDate=2011-09-30&_wchp=dGLbVIS-zSkzS&_md5=135c2479d25899da7607f77106f74970/1-s2.0-S0009912011013919-main.pdf

16. Tian Y, Green PG, Stamova B, Hertz-Picciotto I, Pessah IN, Hansen R, et al. Correlations of gene expression with blood lead levels in children with autism compared to typically developing controls. Neurotoxicity Research. [Internet]. 2011 [cited 10 Dec 2011];19(1):[about 6 p.]. Available from: <http://hinari-gw.who.int/whalecomwww.springerlink.com/whalecom0/content/62718544u3168761/fulltext.pdf>

17. Yorbik O, Kurt I, Ha?imi A, Oztürk O. Chromium, Cadmium, and Lead Levels in Urine of children with autism and typically developing controls. Biol Tr Elem Res. [Internet]. 2009 [cited 9 Dec 2011];135(1-3): [about 5 p.]. Available from: <http://hinari-gw.who.int/whalecomwww.springerlink.com/whalecom0/content/925j08720721k188/fulltext.pdf>

18. Lakshmi Priya MD, Geetha A. Level of trace elements (copper, Zinc, magnesium and Selenium) and toxic elements (lead and Mercury) in the Hair and Nail of Children with Autismo. Biol Tr Elem Res. 2011;142(2):148-58.

19. Ayodele JT, Bayero AS. Lead and zinc concentrations in hair and nail of some kano inhabitants. African J Env Sci Tech. [Internet]. 2009 Jun [cited 9 Dec 2011]; 3(6): [about 5 p.]. Available from: <http://www.academicjournals.org/ajest/PDF/pdf%202009/Jun/Ayodele%20and%20Bayero%20pdf.pdf>
20. Kedzierska E. Concentrations of selected bioelements and toxic metals and their influence on health status of children and youth residing in Szczecin. Ann Acad Med Stetin. 2003; 49: 131-43.
21. El-Ansary A, Al-Daihan S, Al-Dbass A, Al-Ayadhi L. Measurement of selected ions related to oxidative stress and energy metabolism in Saudi autistic children. Clinic Biochem. [Internet]. 2010 [cited 9 Dec 2011]; 43(1-2): [about 4 p.]. Available from: http://hinari-gw.who.int/whalecompdn.sciencedirect.com/whalecom0/science?_ob=MiamiImageURL&_cid=271896&_user=2778716&_pii=S0009912009004020&_check=y&_origin=browse&_zone=rslt_list_item&_coverDate=2010-01-31&wchp=dGLbVIV-zSkWA&md5=8fdb3e9ad8e0f930b0627946bc21dccc/1-s2.0-S0009912009004020-main.pdf
22. Sultana R, Perluigi M, Butterfield DA. Protein oxidation, lipid peroxidation in brain of subjects with Alzheimer's disease: insights into mechanism of neurodegeneration from redoxproteomics. Antioxidants Redox Signaling. [Internet]. 2006 [cited 11 Dec 2011]; 8(11-12): about 3 p.]. Available from: <http://hinari-gw.who.int/whalecomonline.liebertpub.com/whalecom0/doi/pdfplus/10.1089/ars.2006.8.2021>
23. Rojas E, López MC, Valverde M. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. Journal of Chromatography Biomedical Sciences and Applications. [Internet]. 1999 Feb [cited 10 Dec 2011]; 722(1-2): [about 5 p.]. Available from: http://hinari-gw.who.int/whalecompdn.sciencedirect.com/whalecom0/science?_ob=MiamiImageURL&_cid=271410&_user=2778716&_pii=S0378434798003132&_check=y&_origin=browse&_zone=rslt_list_item&_coverDate=1999-02-05&wchp=dGLzVIS-zSkWA&md5=e53a2ab93d733a229dfd16626e9d7ad9/1-s2.0-S0378434798003132-main.pdf
24. Prieto EA, Llópiz ND. Normalización de la electroforesis de células individuales (ensayo de cometa). Rev Cubana Invest Biomed. [Internet]. 1999 [citada 11 Dic 2011]; 18(1): [aprox 1 p.]. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/ibi/v18n1/ibi13199.pdf>
25. Tice RR, Agurell E , Andreson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, et al. Single cell gel/Comet assay: Guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. Environmental and Molecular Mutagenesis. [Internet]. 2000 [cited 11 Dec 2011]; 35(3): [about 5 p.]. Available from: [http://hinari-gw.who.int/whalecomonlinelibrary.wiley.com/whalecom0/doi/10.1002/\(SICI\)1098-2280\(2000\)35:3%3C206::AID-EM8%3E3.0.CO;2-J/pdf](http://hinari-gw.who.int/whalecomonlinelibrary.wiley.com/whalecom0/doi/10.1002/(SICI)1098-2280(2000)35:3%3C206::AID-EM8%3E3.0.CO;2-J/pdf)
26. Vindas R, Ortiz F, Ramírez V, Cuenca P. Genotoxicidad de tres plaguicidas utilizados en la actividad bananera de Costa Rica. Rev Biol Trop. [Internet]. 2004 [citado 11 de diciembre de 2011]; 52(3): [about 5 p.]. Available from: http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S0034-77442004000300022&script=sci_arttext

27. Collins AR, Oscoz AA, Brunborg G, Gaivao I, Giovannelli L, Kruszewski M, et al. The comet assay: topical issues. *Mutagenesis*. [Internet]. 2008 [cited 11 Dec 2011];23(3): about 5 p.]. Available from: <http://hinari-gw.who.int/whalecommutage.oxfordjournals.org/whalecom0/content/23/3/143.full.pdf+html>
28. Sajdel-Sulkowska EM, Xu M, Koibuchi N, McGinnis W. Brain region-specific changes in oxidative stress and neurotrophin levels in autism spectrum disorders (ASD). *Am Jour Biochem Biotech*. 2011; 10(1): 43-8.
29. Melnyk S, Fuchs GJ, Schulz E, Lopez M, Kahler SG, Fussell JJ, et al. Metabolic Imbalance Associated with Methylation Dysregulation and Oxidative Damage in Children with Autism. *Jour Aut Devel Dis*. [Internet]. 2011 [cited 11 Dec 2012];42(3):367-77. Available from: <http://hinari-gw.who.int/whalecomwww.springerlink.com/whalecom0/content/kt7270522268j017/fulltext.pdf>
30. Sajdel-Sulkowska EM, Xu M, Koibuchi N. Increase in Cerebellar Neurotrophin-3 and Oxidative Stress Markers in Autism. *Am Jour Biochem Biotech*. 2009;8(3):366-72.

Recibido: 3 de abril de 2012.

Aprobado: 23 de noviembre de 2012.

Dra. *Elena Noris-García*. Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología. Calle Infanta #1158 e/ Línea y Clavel. La Habana, Cuba. Correo electrónico: anoris@infomed.sld.cu